



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Hematologia

### **Leucemia Linfoblástica Aguda: a aplicação da imunoterapia com células T CAR**

João Francisco Sousa Gouveia

---

**Junho'2019**



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Hematologia

### **Leucemia Linfoblástica Aguda: a aplicação da imunoterapia com células T CAR**

João Francisco Sousa Gouveia

**Orientado por:**

Dr. Carlos Manuel Varela Martins

---

**Junho'2019**

## Resumo

A Leucemia linfoblástica aguda (LLA) corresponde a uma doença neoplásica da linhagem linfóide das células sanguíneas, que apresenta uma maior prevalência e um prognóstico mais favorável na idade pediátrica comparativamente à idade adulta.

O surgimento de resistências e de recidivas face aos tratamentos convencionais da LLA, assim como a escassez de terapias alternativas, tornaram a abordagem clínica destes casos mais deficitária e menos eficaz.

Os avanços feitos na compreensão da patogénese da LLA, trouxeram concomitantemente o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, sendo a imunoterapia uma das abordagens mais promissoras no que concerne ao tratamento desta doença, bem como ao de outras neoplasias linfóides.

As células T CAR representam uma nova e emergente ferramenta imunoterapêutica, que tem mostrado recentemente uma boa aplicabilidade na LLA de células B (LLA-B), especialmente nos casos refractários e recidivantes à quimioterapia e ao transplante alogénico de células estaminais. Neste contexto, foi aprovado recentemente pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), o primeiro produto de células T CAR específico para o antígeno CD19 e que se denomina por Tisagenlecleucel.

Todavia, muito poucas terapêuticas são capazes de oferecer uma boa resposta clínica sem, em contrapartida, apresentarem qualquer tipo de toxicidade. No caso concreto das células T CAR, poderão estar associados determinados efeitos secundários, tais como a síndrome de libertação de citocinas, a neurotoxicidade e a aplasia de células B.

A imunoterapia com células T CAR é uma técnica que se encontra em desenvolvimento. A sua incorporação nos actuais esquemas terapêuticos da LLA encontra-se dependente de futura investigação, que possa vir a melhorar a sua eficácia e diminuir a sua toxicidade.

Palavras-chave: Leucemia linfoblástica aguda; Células T CAR; Imunoterapia; Cancro; Aplicações clínicas.

## Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a neoplastic disease of the lymphoid lineage of the blood cells that has a greater prevalence and a more favorable prognosis in the pediatric age compared to the adult age.

The emergence of resistance and relapse related to conventional treatments for ALL, as well as the scarcity of alternative therapies, have made the clinical approach to these cases more deficient and less effective.

The best understanding of the pathogenesis of ALL has brought about the development of new therapeutic options. The immunotherapy is one of the most promising approaches to the treatment of this disease but also for other lymphoid neoplasms.

CAR T cells represent a new and emerging immunotherapeutic tool, which has shown good applicability in B cell ALL, especially in refractory and relapsed cases to the chemotherapy and allogeneic stem cell transplant. In this setting, the *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) has recently approved the first CAR T-cell product specific to the CD19 antigen, named Tisagenlecleucel.

However, very few therapies offer a good clinical response without presenting any kind of toxicity. For this reason, certain side effects may be associated with CAR T cells infusion, such as cytokine release syndrome, neurotoxicity and B-cell aplasia.

CAR T-cell immunotherapy is a technique that is under development. Its incorporation into the current therapeutic regimens of ALL is dependent on future research which may improve its efficacy and decrease its toxicity.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; Chimeric antigen receptor T cells; Immunotherapy; Cancer; Clinical applications.

## Índice

1. <b>Introdução</b> .....	6
2. <b>Imunoterapia com células T CAR</b> .....	8
2.1. Fundamento teórico.....	8
2.2. Estrutura geral dos CARs.....	8
2.3. Gerações de CARs.....	10
2.4. Procedimentos pré-transfusionais.....	11
3. <b>Da aplicação terapêutica aos resultados clínicos</b> .....	12
4. <b>Efeitos tóxicos</b> .....	16
4.1 Síndrome de libertação de citocinas.....	17
4.2 Linfocitose hemofagocítica.....	18
4.3 Neurotoxicidade.....	18
4.4 Toxicidade no alvo / extra-tumor.....	19
4.5 Toxicidade associada ao sistema de introdução de genes.....	19
4.6 Reacção alérgica.....	20
5. <b>Perspectivas futuras</b> .....	20
5.1 Tratamento combinado.....	21
5.2 “Genes de eliminação” ou “Genes-suicidas”.....	21
5.3 Células T CAR com reconhecimento antigénico combinado.....	22
6. <b>Conclusão</b> .....	23
7. <b>Agradecimentos</b> .....	24
8. <b>Referências bibliográficas</b> .....	25

## 1. Introdução

A Leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica que se caracteriza pela proliferação e diferenciação anormal das populações de células linfóides imaturas a nível da medula óssea, do sangue periférico e de locais extramedulares.<sup>1-3</sup>

A incidência mundial da LLA está estimada em cerca de 1 a 5 casos por 100 000 habitantes ao ano.<sup>4, 5</sup> Além disso, esta doença apresenta-se com uma distribuição bimodal, cujos picos se situam na infância e na 5ª década de vida.<sup>1,3</sup>

A LLA está assim classificada em leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) e em leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T),<sup>6</sup> sendo que mais de dois em cada três casos de LLA correspondem a LLA-B.<sup>4,5</sup>

A estratificação do risco da LLA permite determinar o tratamento inicial mais apropriado para cada caso, assim como quando considerar o transplante alogénico de células estaminais.<sup>1</sup> Para a estratificação do risco são utilizados determinados critérios que englobam a idade, a contagem de leucócitos, as alterações citogenéticas, a ploidia, o subtipo imunológico e a resposta ao tratamento inicial.<sup>7,8</sup>

Actualmente, a resposta ao tratamento inicial é avaliada na prática clínica pela doença residual mínima (DRM), através de técnicas moleculares como a citometria de fluxo e a PCR.<sup>9</sup> A presença de DRM após terapia de indução é um marcador independente de mau prognóstico, significando que a doença é de certo modo refractária à terapêutica.<sup>3</sup>

Apesar de 85 a 90% dos doentes com LLA entrarem em fase de remissão após terapia de indução, existem subgrupos de doentes que são refractários a esta ou que recidivam após um período em remissão da doença.<sup>1</sup>

A taxa de sobrevivência global, em crianças com diagnóstico de novo de LLA, é de aproximadamente 90%. No entanto, sensivelmente 10 a 15% dessas crianças irão recidivar. Nos casos de primeiras recidivas de LLA, a taxa de sobrevivência livre de doença mantém-se ainda entre os 35 e os 50%.<sup>10</sup>

Embora uma segunda remissão completa seja passível de ser alcançada na grande maioria dos doentes pediátricos, aproximadamente 55% destes doentes virão novamente a recidivar.<sup>10</sup> O surgimento de segundas e terceiras recidivas da doença não é todavia animador, pois encontra-se associado a um mau prognóstico.

Nos adultos com diagnóstico de LLA de novo, a taxa de sobrevivência global a longo-prazo é ainda substancialmente inferior à verificada nos doentes pediátricos. Nestes casos, a sobrevivência global restringe-se entre os 30 e os 45%, nos adultos com menos de 60 anos, e aproximadamente a 10%, naqueles com mais de 60 anos.<sup>11</sup> Nos quadros de LLAs recidivantes, a taxa de sobrevivência livre de doença a longo-prazo limita-se entre os 7 e os 24%, mesmo após transplante alogénico de células estaminais.<sup>12</sup>

As condicionantes da idade bem como um maior número de factores de risco e de comorbilidades na altura do diagnóstico, implicam reduções das doses de quimioterapia.<sup>3</sup> Estes problemas associados ao desenvolvimento de resistências face à quimioterapia, explicam de certa forma as menores taxas de sobrevivência verificadas na população adulta.<sup>2</sup>

Nos últimos anos têm sido feitos desenvolvimentos na redefinição da classificação das leucemias linfoblásticas agudas, na identificação de alterações citogenéticas e moleculares e na criação de terapêuticas cada vez mais direccionadas, no sentido de melhorar a sobrevivência global da doença.<sup>1-3</sup>

Uma nova forma de imunoterapia, caracterizada por utilizar células geneticamente modificadas, tem vindo a mostrar uma boa aplicabilidade em neoplasias linfóides de células B. Esta terapia vem assim colmatar a existência de uma lacuna terapêutica, que se tem evidenciado nos casos refractários e/ou recidivantes às abordagens terapêuticas convencionais.<sup>2</sup>

Com esta revisão sistemática pretende-se apresentar o estado actual desta nova terapia, da qual fazem parte as células T CAR, bem como o impacto que esta poderá vir a ter no tratamento da LLA. Inicialmente, serão abordados os fundamentos teóricos desta técnica, a sua estrutura molecular, as suas diferentes gerações assim como todo o processo subjacente a este tratamento. Posteriormente, será feita uma análise sobre as suas aplicações, resultados e limitações na prática clínica.

Por último, mas certamente não menos importante, serão também abordadas as perspectivas futuras desta terapêutica, as quais estão relacionadas não só com a diminuição dos seus efeitos secundários, mas também com o aumento da sua eficácia no tratamento dos casos recidivantes e/ou refractários da LLA.

## 2. Imunoterapia com células T CAR

### 2.1. Fundamento teórico

As células T CAR correspondem a células T geneticamente modificadas e que expressam receptores antigénicos quiméricos (*Chimeric Antigen Receptors* - CARs). Estes receptores são integrados nas células T com o intuito de reprogramar a sua especificidade contra antígenos específicos tumorais.<sup>13</sup>

A reprogramação destas células é feita através de um mecanismo independente do Complexo Major da Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC),<sup>14</sup> o que permite às células T CAR ultrapassar um dos principais mecanismos de evasão das células cancerígenas, o qual consiste na sub-expressão das moléculas MHC.<sup>13, 15</sup>

Para além de poder ser utilizada quer em células CD4<sup>+</sup> quer em células CD8<sup>+</sup>, esta terapia também possibilita a identificação de alvos moleculares, como epítomos de proteínas, hidratos de carbono e glicolípidos.<sup>13, 16</sup> Deste modo, o número de potenciais alvos torna-se mais abrangente.<sup>15</sup>

### 2.2. Estrutura geral dos CARs

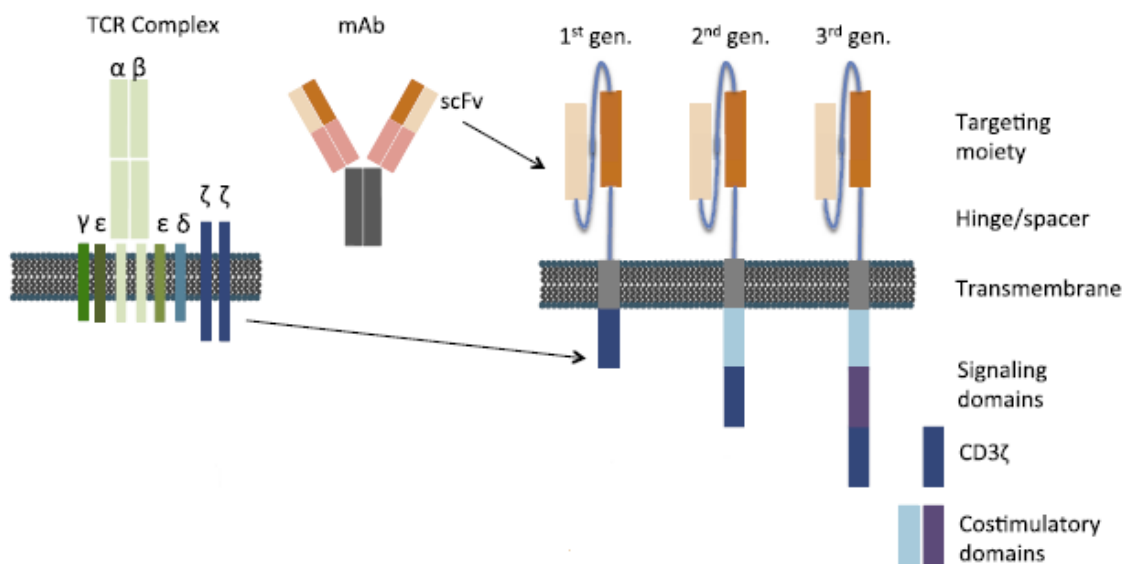
A estrutura geral dos receptores antigénicos quiméricos engloba múltiplos domínios ligados em série, sendo os quais: um ectodomínio de reconhecimento antigénico; um espaçador extracelular; um elemento transmembranar; e um endodomínio de sinalização (Figura 1).<sup>13, 16, 17</sup>

O ectodomínio de reconhecimento antigénico é determinante para a especificidade antigénica das células T CAR e está dependente da incorporação de um fragmento variável de cadeia simples (*single-chain variable fragment* - scFv), o qual é derivado de um anticorpo monoclonal. Este ectodomínio permite que as células T CAR possam ser activadas e consigam reconhecer os antígenos presentes na superfície das células-alvo, isto de um modo independente das moléculas MHC.<sup>18, 19</sup>



O espaçador extracelular e o elemento transmembranar facilitam a ligação entre o ectodomínio de reconhecimento antigénico e o endodomínio de sinalização, apresentando assim um papel predominantemente estrutural no CAR.<sup>16, 20</sup> Para além do seu papel a nível estrutural, o espaçador extracelular proporciona também a mobilidade e a distância necessária para uma correcta ligação entre o ectodomínio de reconhecimento antigénico e a membrana celular, sendo que a distância ideal está dependente do alvo antigénico.<sup>16</sup> Relativamente ao endodomínio transmembranar, este não só é essencial para o estabelecimento da ligação com os outros elementos que formam o complexo TCR/CD3, como também exerce um papel importante no aperfeiçoamento do sinal de ativação que é enviado.<sup>21</sup>

O endodomínio de sinalização é responsável pelo sinal de ativação que é enviado pelas células T CAR e é constituído por domínios de ativação das células T e por domínios co-estimuladores, tais como o CD27, CD28, CD134 (OX40), ICOS, DAP10 e CD137 (4-1BB).<sup>16, 20</sup> A presença de diferentes domínios intracelulares determina a origem de diferentes gerações de células T CAR.<sup>18</sup>



**Figura 1:** Características estruturais dos receptores antigénicos quiméricos. Retirado de Whilding, L. M., Maher, J. (2015). CAR T-cell immunotherapy: The path from the by-road to the freeway? *Molecular Oncology* 9(10):1994-2018.

### 2.3. Gerações de CARs

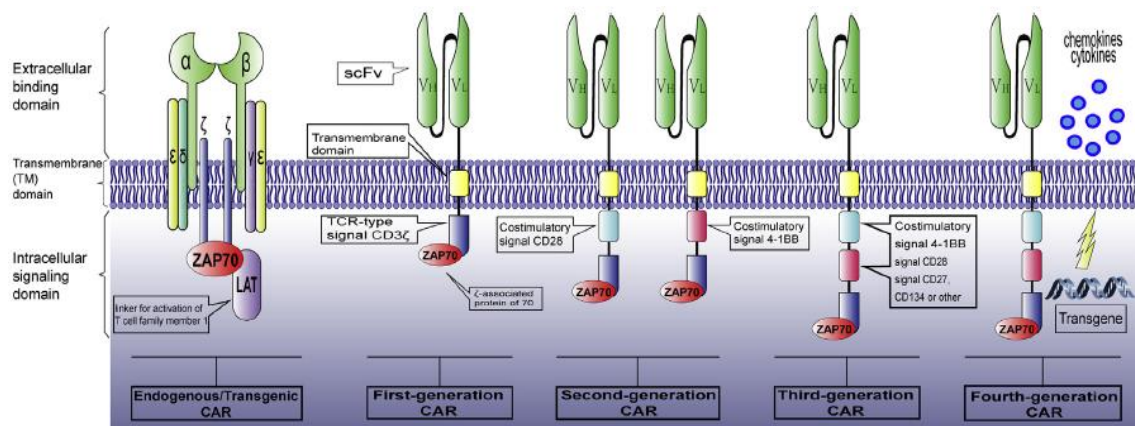
A estrutura dos CARs tem evoluído progressivamente ao longo destes últimos anos. Com o intuito de melhorar a eficácia desta terapia, foram já criadas quatro gerações de CARs (Figura 2).<sup>20</sup>

A primeira geração de células T CAR contém apenas um único domínio de activação da célula T, o qual é derivado da cadeia CD3ζ do complexo TCR/CD3.<sup>16</sup> Este domínio é assim responsável por fornecer o “sinal 1” para a activação da respectiva célula.<sup>22</sup> Como estas células não expressam domínios co-estimuladores, apresentam uma expansão e persistência in vivo limitadas,<sup>23</sup> não ocorrendo deste modo uma proliferação sustentada destas células.<sup>16</sup>

No sentido de melhorar a funcionalidade destas mesmas células foram criadas a segunda e a terceira gerações, as quais correspondem a células T CAR que possuem respectivamente mais um ou dois domínios co-estimuladores, sendo que estes se encontram ligados em série com o componente CD3ζ do TCR.<sup>16</sup>

A adição dos domínios co-estimuladores permite a transmissão de um segundo sinal (“sinal 2”), o qual promove uma melhor proliferação e sobrevivência das células T CAR,<sup>20</sup> bem como uma maior libertação de citocinas.<sup>24, 25</sup>

A quarta geração de células T CAR inclui as denominadas células T TRUCK (*T cells redirected for universal cytokine killing*). Estas células são caracterizadas por integrar um elemento adicional, designado por “factor nuclear de expressão de resposta da célula T activada”.<sup>14, 15</sup> Este novo elemento permite a produção programada de citocinas transgénicas (por exemplo, a IL-12), as quais contribuem para a diminuição da apoptose, para o aumento da proliferação celular e da citotoxicidade,<sup>20</sup> bem como para a superação do microambiente hostil característico dos tumores sólidos.<sup>26, 27</sup>



**Figura 2:** Gerações de células T CAR. Retirado de Han, X., Wang, Y., Han, W.-D. (2018). Chimeric antigen receptor modified T-cells for cancer treatment. *Chronic Diseases and Translational Medicine* 4(4):225-243.

#### 2.4. Procedimentos pré-transfusionais

O processo subjacente a esta terapia envolve geralmente a colheita das células T, a ativação, selecção e proliferação das células T, a transferência genética do componente CAR, a expansão celular ex-vivo, a indução da depleção linfocítica (quimioterapia) e a administração das células T modificadas no doente (Figura 3).<sup>15, 23</sup>

A colheita das células T é feita primeiramente a partir do sangue periférico do doente, por leucaférese ou por flebotomia. A amostra colhida é posteriormente submetida a um processo de aférese, para isolamento das células T.<sup>14</sup>

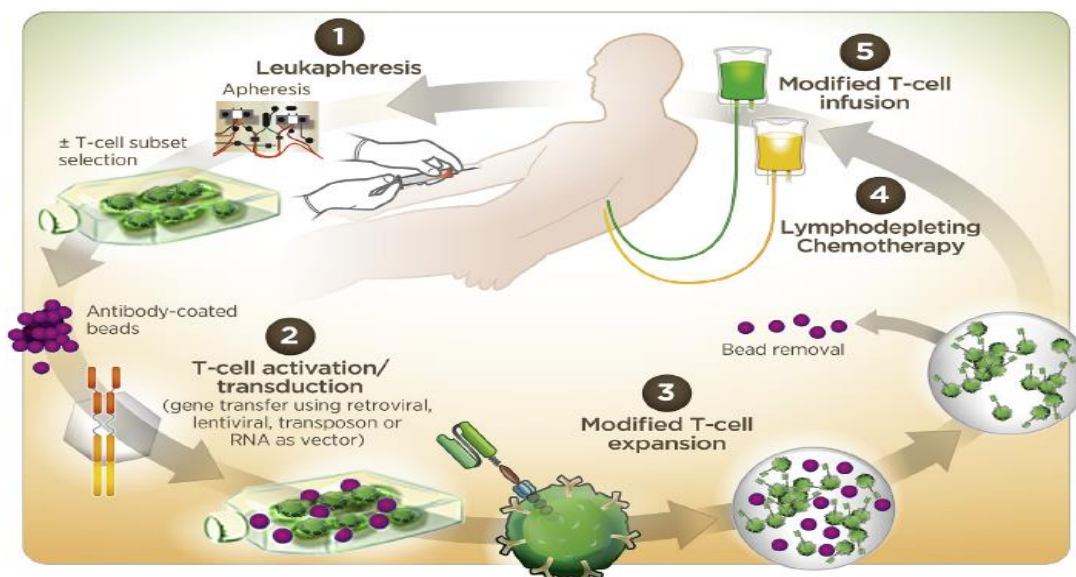
Segue-se a activação celular que é normalmente desencadeada por CD3 ou CD8, os quais funcionam como células dendríticas artificiais, que garantem a expansão das células T até números terapêuticos.<sup>28, 29</sup>

Após esta etapa do processo, é inserida a sequência genética que codifica o CAR, através de transdução viral (retrovírus ou lentivírus)<sup>15</sup> ou de sistemas não-virais, tal como a electroporação.<sup>30, 31</sup>

Em seguida, as células são novamente submetidas a processos de expansão ex-vivo e de purificação, sendo estes processos determinantes para a eficácia deste tipo de imunoterapia. São posteriormente realizados testes de qualidade celular e de esterilidade,<sup>14</sup> de modo a garantir a exclusão de contaminações do meio, antes da administração das células no doente.

Previamente à infusão das células T CAR no doente, é realizada quimioterapia, geralmente com ciclofosfamida e fludarabina.<sup>15</sup> Esta etapa do procedimento pré-transfusional tem como propósito a indução da depleção linfocítica, a diminuição da massa tumoral e o aperfeiçoamento da expansão e persistência in vivo das células T CAR,<sup>2</sup> por remoção das células T reguladoras.<sup>32</sup>

O último passo é efectivamente a infusão das células T CAR no doente.<sup>33</sup>



**Figura 3:** Esquema geral do tratamento com células T CAR anti-CD19. Retirado de Frey, N. (2017). The what, when and how of CAR T cell therapy for ALL. *Best Practice and Research: Clinical Haematology* 30(3):275-281.

### 3. Da sua aplicação terapêutica aos resultados clínicos

Nos últimos anos, grandes ensaios clínicos têm sido publicados por grupos da *University of Pennsylvania* (UPenn), do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) e do *National Cancer Institute* (NCI), tendo todos eles destacado a viabilidade da obtenção de taxas de remissão completa em doentes, quer da população pediátrica quer da população adulta, com LLA-B recidivante e/ou refractária.<sup>16, 23</sup>

Existem presentemente vários alvos antigénicos em estudo, nomeadamente o CD19 e o CD22 para as LLA-B<sup>2</sup> e o CD5 para as LLA-T.<sup>34</sup> O CD19 é actualmente o alvo antigénico mais atractivo desta terapia, uma vez que é expresso na grande maioria das neoplasias linfóides de células B.<sup>2</sup> Deste modo, nestes estudos foram utilizadas células T CAR anti-CD19 de segunda geração, que continham diferentes domínios co-estimuladores, como o CD28 (no MSKCC e NCI) ou o 4-1BB (na UPenn).<sup>16, 23</sup>

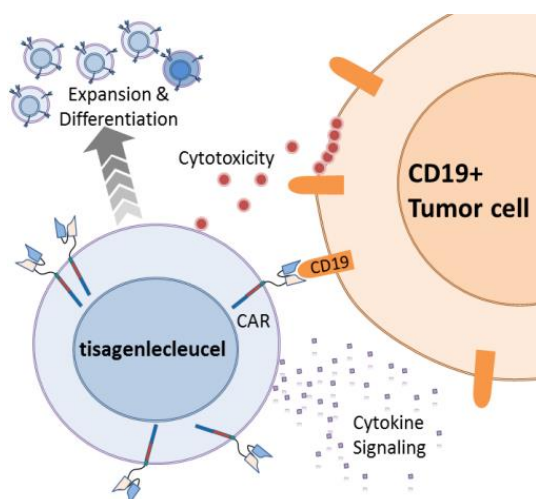
O MSKCC foi um dos primeiros a publicar resultados relativamente à aplicabilidade das células T CAR anti-CD19 de segunda geração, em doentes adultos com LLA-B.<sup>28</sup> Em 2013, Brentjens e colaboradores<sup>35</sup> demonstraram terem sido alcançadas remissões completas com doença residual mínima negativa, em cinco doentes com LLA-B recidivante. Mais recentemente, Davila e colaboradores<sup>36</sup> reportaram os resultados de 16 doentes tratados com esta terapia, tendo-se verificado uma taxa de remissão completa de 88%. Em 2015, na conferência da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), apresentaram-se os resultados de um ensaio de fase I, em que Park e colaboradores<sup>37</sup> demonstraram a obtenção de uma taxa de remissão completa global de 91%, nos 32 doentes avaliados. Em todo este estudo coorte, desenvolvido no MSKCC, um total de 53 doentes adultos com LLA-B recidivante recebeu tratamento com células T CAR anti-CD19 de segunda geração. Após a infusão desta terapia, 83% dos doentes alcançaram remissões completas da doença e 67% dos doentes avaliados alcançaram remissões completas com doença residual mínima negativa. Verificou-se também que os doentes que, anteriormente à infusão do tratamento, tinham uma reduzida massa tumoral (menos de 5% de blastos na medula óssea), apresentaram uma menor incidência de efeitos secundários, nomeadamente da síndrome de libertação de citocinas e da neurotoxicidade, bem como sobrevivências livres de doença e globais mais duradouras que as demonstradas pelos doentes com uma maior massa tumoral.<sup>38</sup>

Suportando os dados anteriormente apresentados, Lee e colaboradores,<sup>39</sup> numa publicação do NCI, mostraram os resultados das células T CAR anti-CD19 em doentes pediátricos e jovens adultos com LLA-B recidivante e/ou refractária. Neste ensaio clínico, foi obtida uma resposta completa em 70% dos doentes, tendo 60% dos doentes avaliados apresentado uma resposta completa com doença residual mínima negativa.<sup>2</sup> A sobrevivência global foi de 51.6% aos 9.7 meses e a sobrevivência livre de doença foi de 78.8% a partir dos 4.8 meses, nos doentes com doença residual mínima negativa. De entre os 12 doentes que obtiveram uma resposta completa com doença residual mínima negativa, dez foram submetidos a transplante alogénico de células estaminais, tendo todos eles permanecido em remissão da doença. Admitiu-se assim a hipótese desta terapia vir a ser utilizada como “ponte” efectiva para um tratamento consolidativo com transplante alogénico de células estaminais.<sup>16</sup> No que diz respeito aos efeitos adversos verificados após a infusão da terapia, constatou-se que os doentes que desenvolveram neurotoxicidade, apresentavam uma maior concentração de células T CAR no líquido cefalorraquidiano, comparativamente aos que não desenvolveram neurotoxicidade.<sup>39</sup>

Semelhante sucesso foi também obtido nos ensaios clínicos desenvolvidos na UPenn, que englobaram não só doentes adultos como também pediátricos.<sup>16</sup> Numa fase preliminar, Grupp e colaboradores<sup>40</sup> demonstraram terem sido alcançadas remissões completas em duas crianças tratadas com células T CAR anti-CD19 e que apresentavam LLA recidivante e/ou refractária. Apesar de uma das crianças ter permanecido em remissão, a outra veio a recidivar passados 2 meses e apresentava células blásticas que já não expressavam o CD19. Foi posteriormente publicado por Maude e colaboradores,<sup>41</sup> num ensaio clínico de fase I, a obtenção de uma taxa de remissão completa de 90%, nos 30 doentes avaliados. No período de 24 meses subsequente à infusão das células T CAR, verificou-se que 19 destes doentes permaneceram em remissão completa e que 7 haviam recidivado, sendo que 3 dos quais apresentavam doença com ausência de expressão do CD19.<sup>16</sup>

A aplicabilidade desta terapia para o tratamento da LLA recidivante e/ou refractária tem merecido a contínua atenção de diversos grupos científicos. Este interesse intensificou-se ainda mais quando, em 2017, foi aprovada pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), a primeira terapia com células T CAR anti-CD19 (*Tisagenlecleucel*), para o tratamento de doentes, até aos 25 anos, com LLA-B recidivante e/ou refractária (Figura 4).<sup>2, 42</sup>

Num ensaio de fase I-IIa, conduzido no *Children's Hospital of Philadelphia* e na *University of Pennsylvania*, Maude e colaboradores mostraram os resultados verificados em 60 crianças e jovens adultos com LLA-B recidivante e/ou refractária e que foram tratadas com a terapia, recentemente denominada por *Tisagenlecleucel*. Neste estudo, foi demonstrada uma taxa de remissão completa de 93%, tendo sido também observado um controlo da doença a longo-prazo sem o recurso a terapia adicional.<sup>43, 44</sup>



**Figura 4:** Representação esquemática dos mecanismos de acção do tisagenlecleucel. Retirado de FDA. (2017). FDA Briefing Document Oncologic Drugs Advisory Committee Meeting - BLA 125646 Tisagenlecleucel Novartis Pharmaceuticals Corporation. FDA: 1-66.

Foi desenvolvido posteriormente um estudo piloto de fase II, que avaliou as respostas do *Tisagenlecleucel* em 75 doentes pediátricos e jovens adultos com LLA-B recidivante e/ou refractária. Neste ensaio clínico, 61% dos doentes foram submetidos a transplante alogénico de células estaminais, isto numa fase prévia à infusão do tratamento. Ao fim de 3 meses, demonstrou-se uma taxa de remissão global de 81%, tendo todos estes doentes apresentado doença residual mínima negativa. Enquanto que aos 6 meses, a taxa de sobrevivência livre de doença foi de 73% e a de sobrevivência global de 90%, aos 12 meses, as taxas de sobrevivência livre de doença e global foram de 50% e de 76%, respectivamente. De entre os efeitos secundários verificados neste estudo, é de salientar a ocorrência da síndrome de libertação de citocinas em 77% dos doentes e de efeitos neurotóxicos em 40% dos doentes avaliados, tendo os quais ocorrido durante as primeiras 8 semanas após a infusão da terapia.<sup>45</sup>

A imunoterapia com células T CAR é uma terapêutica que, apesar de ainda não estar totalmente desenvolvida, tem vindo a apresentar resultados muito positivos. Até à data, múltiplos ensaios clínicos com células T CAR anti-CD19, demonstraram taxas de remissão completa entre os 70 e os 90%, quer em crianças quer em adultos com LLA-B recidivante. Todavia, é necessário ter alguma precaução na análise de alguns dos resultados publicados, uma vez que na grande maioria dos ensaios clínicos realizados, os período de seguimento foram de curta duração.<sup>38</sup>

A variabilidade dos resultados entre os ensaios clínicos publicados, poderá ser explicada tendo por base as diferenças entre as células T CAR utilizadas, os tamanhos das massas tumorais existentes previamente à infusão desta terapia, as histórias dos tratamentos prévios realizados, bem como as populações que são infundidas com esta terapêutica.<sup>16, 23</sup>

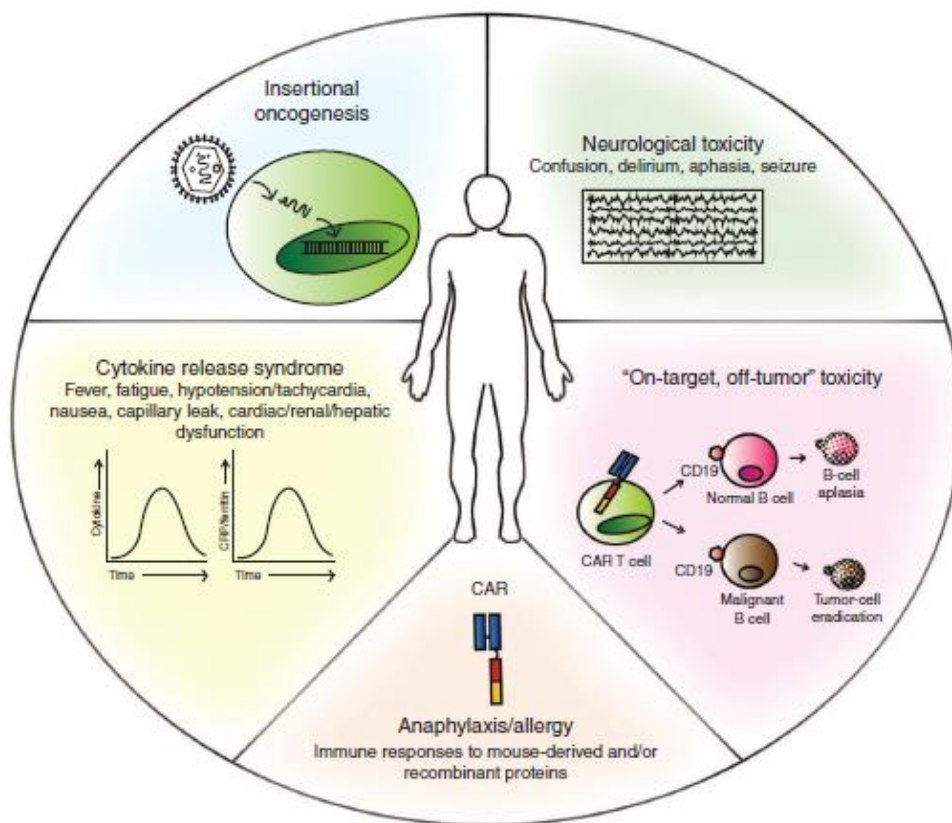
O controlo da doença a longo-prazo pode estar em grande parte dependente da persistência das células T CAR, embora ainda seja desconhecida qual deva ser a duração ideal dessa persistência. Contudo, existem algumas evidências que mostram que as células T CAR anti-CD19 que contêm o 4-1BB como domínio co-estimulador, podem apresentar um período de persistência mais prolongado (até 2 anos) comparativamente ao seu homólogo CD28 (entre 1 a 3 meses).<sup>16</sup>

No entanto, futuros ensaios clínicos com períodos de seguimento mais prolongados são necessários para uma melhor descrição da durabilidade destas remissões.



#### 4. Efeitos tóxicos

A terapia com células T CAR tem um perfil único de toxicidade que não é fácil de prever nem de avaliar, uma vez que este perfil varia consoante o componente CAR que é usado.<sup>46</sup> De entre os efeitos adversos que podem surgir, destacam-se aqueles que são mais graves e que podem pôr em risco a vida dos doentes, particularmente a síndrome de libertação de citocinas (SLC), a neurotoxicidade<sup>47</sup> e a aplasia de células B.<sup>48</sup> Existem, porém, outros efeitos adversos igualmente associados à imunoterapia com células T CAR (Figura 4).<sup>48</sup>



**Figura 4:** Toxicidades da terapia com células T CAR. Retirado de Bonifant, C. L., Jackson, H. J., Brentjens, R. J., Curran, K. J. (2016). Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy – Oncolytics* 3:16011.



#### 4.1. Síndrome de libertação de citocinas

A Síndrome de libertação de citocinas (SLC) caracteriza-se como o efeito adverso mais prevalente após a administração de uma terapêutica com células T CAR<sup>46, 48</sup> e surge tipicamente entre o 1º e o 14º dia após a infusão das células T CAR.<sup>23</sup>

É desencadeada pela activação e proliferação das células T, resultando numa produção excessiva de citocinas por outras células do sistema imunitário e, por conseguinte, numa resposta inflamatória sistémica.<sup>46</sup>

Está assim associada a uma libertação excepcionalmente aumentada de uma determinada citocina inflamatória, a interleucina 6 (IL-6). Contudo, verificam-se níveis igualmente elevados de outras citocinas, tais como de interferão-gama (IFN- $\gamma$ ), factor de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), factor estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2) e de interleucina 10 (IL-10).<sup>23, 46, 47</sup>

Além disso, verificam-se frequentemente alterações analíticas de alguns parâmetros inflamatórios, as quais são representadas por níveis elevados da proteína C-reactiva (PCR) e da ferritina.<sup>23</sup>

A sua apresentação clínica pode ser auto-limitada, com febre alta, fadiga e mialgias; ou manifestar-se por quadros mais graves, com hipotensão arterial, insuficiência respiratória e renal, citopenias, coagulopatias e disfunção multi-órgão.<sup>23, 46</sup>

Estes diferentes graus de intensidade da SLC, encontram-se relacionados com a percentagem de blastos (massa tumoral) presente na medula óssea,<sup>16</sup> aquando da infusão das células T CAR.<sup>23</sup> Como tal, quanto maior for a percentagem de blastos na medula óssea, aquando da infusão das células T CAR, mais graves serão as manifestações clínicas da SLC.

Em situações ligeiras da SLC, esta poderá ser controlada apenas com tratamento sintomático, o qual pode incluir fluidoterapia e/ou aporte de oxigénio. No entanto, em casos mais graves poderá ser necessário associar o suporte vasopressor com determinados agentes terapêuticos, como o anticorpo antagonista do receptor da IL-6 (tocilizumab) e os corticosteróides.<sup>16, 46</sup>

O tocilizumab é actualmente a terapêutica de primeira linha para a SLC. A inibição do receptor da IL-6 efectuada por este anticorpo monoclonal, permite uma gestão controlada deste tipo de toxicidade sem, aparentemente, comprometer o efeito anti-tumoral das células T CAR.<sup>23</sup>

#### 4.2. Linfohistiocitose hemofagocítica

A SLC severa pode evoluir, em certos casos, para a Linfohistiocitose hemofagocítica (LHH), a qual é também referida como Síndrome de activação macrofágica (SAM).<sup>46</sup>

A identificação da LHH/SAM é, no entanto, difícil devido à sua semelhante apresentação clínica e laboratorial com a SLC.<sup>47</sup> Ambas poderão apresentar febre, hipofibrinogenemia e valores elevados de ferritina e de citocinas, nomeadamente IL-2R (CD25)<sup>47</sup> e IFN- $\gamma$ .<sup>46</sup>

A LHH/SAM engloba um grupo de doenças imunes severas, caracterizadas pela hiperactivação de macrófagos e linfócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias, infiltração de células linfohistiocíticas e disfunção multi-órgão.<sup>49</sup>

O tratamento da LHH/SAM é feito com corticosteróides e/ou com tocilizumab, embora esta síndrome possa, em alguns casos, ser refractária a estas terapêuticas. Nesta situação, será necessária uma imunossupressão mais activa, a qual poderá incluir regimes baseados em etoposido.<sup>46, 49</sup>

#### 4.3. Neurotoxicidade

A neurotoxicidade representa o segundo efeito adverso mais comum associado a esta terapêutica,<sup>20</sup> tendo este sido reportado em casos de administrações de células T CAR específicas para CD19.<sup>41, 48</sup>

As toxicidades neurológicas das células T CAR ocorrem em média uma semana após a infusão,<sup>50</sup> sendo que na maioria dos casos esta condição é reversível.<sup>36, 39</sup>

Apesar de a causa fisiopatológica destes efeitos neurológicos ainda permanecer desconhecida, põe-se a hipótese de que estes efeitos possam estar relacionados com dois mecanismos em especial: ou com a difusão passiva de citocinas para o Sistema Nervoso Central (SNC); ou com a mobilização das células T CAR para o SNC, sendo estas a causa directa da neurotoxicidade.<sup>47, 48</sup>

A neurotoxicidade tem sido também associada à dimensão da massa tumoral, aquando da infusão das células T CAR, bem como ao pico de expansão das células T.<sup>47</sup>

Nesta condição, podem apresentar-se as seguintes manifestações clínicas: confusão, delírium, obnubilação, alucinação, encefalopatia, afasia, mioclonias, cefaleias e crises epilépticas.<sup>41, 46 - 48</sup> Em situações mais graves, poderá mesmo surgir edema cerebral rapidamente progressivo, o qual pode originar um quadro potencialmente fatal de herniação.<sup>39, 47</sup>

Para o seu tratamento, é sugerido o uso de corticosteróides.<sup>46</sup> A sua resolução sintomática é estimada dentro de um período de quatro semanas.<sup>20</sup>

#### 4.4. Toxicidade no alvo / extra-tumor

O alvo antigénico ideal é aquele que é exclusivo das células tumorais. No entanto, a maioria dos alvos das células T CAR apresentam uma expressão partilhada com células perfeitamente normais do nosso organismo.<sup>48</sup>

Como tal, as células T CAR ao reconhecerem um antígeno específico, este tanto poderá pertencer a uma célula que é neoplásica como a uma que é saudável, provocando desta forma a morte celular indiscriminada das duas populações. A esta reacção adversa damos o nome de toxicidade no alvo/extra-tumor (“on target/off-tumor” toxicity).<sup>51</sup>

No contexto das células T CAR específicas para o antígeno CD19, o facto de as células B normais apresentarem este mesmo antígeno, torna-as num alvo desta terapia e poderá ter como resultado uma aplasia das células B, possivelmente associada a hipogamaglobulinemia. A administração de imunoglobulinas, particularmente IgG,<sup>41</sup> poderá exercer o efeito profiláctico necessário, face ao possível surgimento de complicações infecciosas.<sup>48</sup>

#### 4.5. Toxicidade associada ao sistema de introdução de genes

Este tipo de toxicidade poderá resultar da transformação maligna dos genes inseridos nas células T, tendo em consideração o potencial mutagénico inerente à introdução de genes nas proximidades de proto-oncogenes.<sup>52</sup>

O risco deste tipo de toxicidade é aparentemente baixo e, até à data, não foram registados quaisquer casos de transformação maligna após a infusão de células T CAR.<sup>48</sup>

No entanto, é recomendável que existam controlos rigorosos nos ensaios clínicos correntes, tendo em vista esta toxicidade.<sup>48</sup>

#### 4.6. Reacção alérgica

O potencial imunogénico dos ectodomínios de reconhecimento antigénico presentes nas células T CAR, resulta do facto de estes serem derivados de anticorpos monoclonais de ratinhos.<sup>48, 53</sup>

Apesar de ser um evento muito raro, o desenvolvimento de uma reacção anafiláctica poderá acontecer em casos concretos de transfusões celulares repetidas.<sup>47</sup>

A humanização dos componentes CARs permitirá eventualmente ultrapassar esta adversidade, bem como melhorar a persistência e eficácia das células T CAR.<sup>48, 54</sup>

### **5. Perspectivas futuras**

A imunoterapia com células T CAR tem demonstrado sucessivos progressos no tratamento de algumas neoplasias hematológicas e, em especial, da LLA.<sup>14</sup> Contudo, a sua inclusão nos algoritmos terapêuticos destas doenças está dependente de futura investigação. Procura-se com a investigação vindoura o melhoramento da eficácia, a diminuição das toxicidades, a redução dos custos e atrasos na administração desta terapia.<sup>46</sup>

A intensa activação imunológica resultante das infusões com células T CAR, promove o surgimento de efeitos adversos indesejados, os quais são considerados como um dos principais focos da investigação actual. Deste modo, vários métodos têm sido propostos com o objectivo de garantir uma aplicação clínica mais segura e efectiva das células T CAR.<sup>14, 16</sup>

### 5.1. Tratamento combinado

#### ➤ **Imunoterapia com células T CAR e quimioterapia**

Existe actualmente um interesse crescente em combinar as terapias convencionais, como a quimioterapia, com a imunoterapia com células T CAR. A ciclofosfamida é um dos agentes melhor estudados em regime combinado com a terapia com células T CAR.<sup>16</sup> O uso destas terapêuticas combinadas tem demonstrado um aumento da persistência das células T CAR específicas para CD19,<sup>28</sup> não só por reduzir o número de células T imunossupressoras como por favorecer a expansão espontânea das células T CAR transferidas.<sup>55</sup>

#### ➤ **Imunoterapia com células T CAR e inibidores de PD-1**

A eficácia das células T CAR pode ser comprometida pelo microambiente tumoral imunossupressor, no qual predominam sinais inibitórios para as células T activadas, mediados pelos receptores do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA4) e da proteína de morte programada-1 (PD-1).<sup>16</sup> A utilização destes mecanismos por parte das células tumorais, permite que estas possam esquivar-se à resposta imune.

Neste contexto, surge uma outra alternativa de tratamento combinado que consiste no uso de células T CAR e de anticorpos bloqueadores destes últimos receptores, particularmente o do PD-1 (pembrolizumab). Este método favorece o aumento e/ou prolongamento da detecção das células T CAR anti-CD19 circulantes,<sup>56</sup> com a consequente melhoria do seu efeito terapêutico,<sup>15</sup> por incremento dos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelas células T CAR no ambiente tumoral.<sup>57</sup>

No entanto, existe uma preocupação inerente a esta combinação terapêutica e que está relacionada com o potencial para a proliferação e activação descontroladas das células T CAR.<sup>16</sup>

### 5.2. “Genes de eliminação” ou “Genes-suicidas” – uma medida de segurança

A persistência das células T CAR após o seu efeito terapêutico estar concluído, assim como o surgimento de toxicidades a ela associadas, são problemáticas que poderão exigir a interrupção terapêutica.<sup>58, 59</sup>

A inclusão de determinados “genes-suicidas” ou “genes de eliminação”, como o CD20, o EGFR e a enzima timidina cinase derivada do vírus herpes simplex, promete ser uma abordagem de futuro, no sentido de resolver algumas das questões de segurança ainda relacionadas com o uso desta terapia.<sup>48</sup>

Estes “interruptores de segurança” são inicialmente incorporados nas células T geneticamente modificadas e funcionam como um sistema que permite a indução da morte celular, através da infusão de rituximab, cetuximab ou ganciclovir, respectivamente.<sup>48, 60</sup>

Uma opção alternativa para a depleção selectiva das células T CAR, consiste no uso de uma proteína quimérica, a caspase 9 induzível (ICasp9), que após exposição a uma determinada molécula (AP1903), sofre um processo de dimerização que activa a cascata apoptótica intrínseca.<sup>48, 61</sup>

### 5.3. Células T CAR com reconhecimento antigénico combinado

O conceito de células T CAR com mais do que um alvo antigénico, representa um dos novos ramos da investigação pré-clínica actual. Perspectiva-se que uma abordagem multi-antigénica por parte das células T CAR, possa contrariar um dos principais mecanismos de resistência neoplásica, que consiste na perda antigénica tumoral.<sup>22</sup>

Esta nova estratégia compreende a concepção de dois tipos de células T modificadas, as TanCAR e as CAR com dupla sinalização. As TanCAR consistem num único componente CAR contendo em simultâneo dois domínios de ligação diferentes, enquanto que as CAR com dupla sinalização são constituídas por dois componentes CAR com dois domínios de ligação diferentes.<sup>62</sup>

Neste contexto, têm sido propostos novos marcadores passíveis de serem integrados nesta técnica, tais como o CRFL2,<sup>63</sup> CD123,<sup>64</sup> CD20, CD22,<sup>65</sup> CD30 e Ig kappa ( $\kappa$ ) de cadeia leve.<sup>66</sup>

Encontram-se actualmente em curso alguns estudos clínicos com células TanCAR específicas tanto para o CD19 como para o CD22, os quais surgiram com o intuito de avaliar a aplicabilidade desta terapia em casos concretos de neoplasias linfóides de células B com perda e/ou ausência de expressão do antígeno CD19.<sup>22</sup>

## 6. Conclusão

Nestes últimos anos, a melhor compreensão da heterogeneidade genética subjacente à LLA, tornou possível o desenvolvimento de novas formas terapêuticas, as quais poderão vir a ser muito vantajosas na lide a esta doença.

As células T CAR consistem assim num instrumento de tratamento que se acredita ser deveras promissor, no que respeita à imunoterapia do cancro. O seu potencial terapêutico tem sido evidenciado em inúmeros ensaios clínicos, os quais mostram resultados muito encorajadores não só para o tratamento da LLA, mas também para o de outras neoplasias linfóides.

Existe assim alguma expectativa face à possível aplicação desta terapia em casos refractários e/ou recidivantes da LLA, considerando que as necessidades terapêuticas requeridas para estes casos não são de todo correspondidas pelas opções de tratamento que actualmente se encontram à nossa disposição.

As limitações ainda inerentes a esta terapia fazem enaltecer a necessidade de uma investigação mais exaustiva nesta área. Deste modo, com as novas pesquisas espera-se alcançar uma redução dos custos e tempos de produção desta terapia, bem como o aumento da sua eficácia e perfil de segurança.

Apesar de ainda ser prematuro, é pretendido que no futuro a aplicação das células T CAR deixe de estar única e exclusivamente concentrada em centros de referência e que possa vir a integrar os algoritmos terapêuticos da maioria das neoplasias linfóides e, possivelmente, os de alguns tumores sólidos.

## **7. Agradecimentos**

Com a realização deste trabalho final do Mestrado Integrado em Medicina, assinala-se o culminar de um percurso de 6 anos, o qual me permitiu fazer amizades duradouras e atingir os objectivos a que me tinha proposto, tanto a nível pessoal como no plano profissional.

Em primeiro lugar, dirijo-me ao Senhor Professor Doutor João Forjaz de Lacerda e ao Senhor Dr. Carlos Martins, a quem gostaria de agradecer toda a disponibilidade que manifestaram ao longo da realização deste trabalho, bem como todas as sugestões e críticas construtivas que tiveram a gentileza de partilhar.

Quero nesta ocasião, expressar o meu agradecimento a todos os meus familiares e amigos, pelo apoio incondicional que sempre senti em todos os momentos deste meu percurso académico.



## 8. Referências bibliográficas

1. Terwilliger, T., Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal* 7(6):e577.
2. Phelan, K.W., Advani, A.S. (2018). Novel Therapies in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports* 13(4):289-299.
3. Paul, S., Kantarjian, H., Jabbour, E. J. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings* 91(11):1645-1666.
4. Redaelli, A., Laskin, B. L., Stephens, J. M., Botteman, M. F., Pashos, C. L. (2005). A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *European Journal of Cancer Care* 14(1):53-62.
5. Dores, G. M., Devesa, S. S., Curtis, R. E., Linet, M. S., Morton, L. M. (2012). Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood* 119(1):34-43.
6. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., *et al.* (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127(20):2391-405.
7. Hann, I., Vora, A., Harrison, G., Harrison, C., Eden, O., Hill, F., *et al.* (2001). Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: results from Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukaemia XI protocol. *British Journal of Haematology* 113(1):103-14.
8. Margolin J.F., Rabi K.R., Steuber C.P., Poplack D.G. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pizzo P.A., Poplack D.G. Eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002; 489.
9. Van Dongen, J. J. M., Van Der Velden, V. H. J., Brüggemann, M., Orfao, A. (2015). Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 125(26):3996-4009.

10. Sun, W., Malvar, J., Sposto, R., Verma, A., Wilkes, J. J., Dennis, R., *et al.* (2018). Outcome of children with multiply relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma study. *Leukemia* 32(11):2316-2325.
11. Rank, C. U., Stock, W. (2018). Should immunologic strategies be incorporated into frontline ALL therapy? *Best Practice and Research: Clinical Haematology* 31(4):367-372.
12. Frey, N. V., Luger, S. M. (2015). How I treat adults with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 126(5):589-96.
13. Tomuleasa, C., Fuji, S., Berce, C., Onaciu, A., Chira, S., Petrushev, B., *et al.* (2018). Chimeric Antigen Receptor T-Cells for the Treatment of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in Immunology* 9:239.
14. Zhao, Z., Chen, Y., Francisco, N. M., Zhang, Y., Wu, M. (2018). The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8(4):539-551.
15. Allegra, A., Innaro, V., Gerace, D., Vaddinelli, D., Musolino, C. (2016). Adoptive immunotherapy for hematological malignancies: Current status and new insights in chimeric antigen receptor T cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 62:49-63.
16. Whilding, L. M., Maher, J. (2015). CAR T-cell immunotherapy: The path from the by-road to the freeway? *Molecular Oncology* 9(10):1994-2018.
17. Sikaria, S., Aldoss, I., Akhtari, M. (2016). Monoclonal antibodies and immune therapies for adult precursor B-acute lymphoblastic leukemia. *Immunology Letters* 172:113-23.
18. Ramachandran, M., Dimberg, A., Essand, M. (2017). The cancer-immunity cycle as rational design for synthetic cancer drugs: Novel DC vaccines and CAR T-cells. *Seminars in Cancer Biology* 45:23-35.
19. Wang, X., Xiao, Q., Wang, Z., Feng, W. L. (2017). CAR-T therapy for leukemia: progress and challenges. *Translational Research* 182:135-144.
20. Han, X., Wang, Y., Han, W.-D. (2018). Chimeric antigen receptor modified T-cells for cancer treatment. *Chronic Diseases and Translational Medicine* 4(4):225-243.

21. Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Bagley, S., Blaylock, M., Holland, M., Gilham, D. E. (2010). The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *The Journal of Immunology* 184(12):6938-49.
22. Biondi, A., Magnani, C. F., Tettamanti, S., Gaipa, G., Biagi, E. (2017). Redirecting T cells with Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Autoimmunity* 85:141-152.
23. Frey, N. (2017). The what, when and how of CAR T cell therapy for ALL. *Best Practice and Research: Clinical Haematology* 30(3):275-281.
24. Brentjens, R. J., Santos, E., Nikhamin, Y., Yeh, R., Matsushita, M., La Perle, K., *et al.* (2007). Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clinical Cancer Research* 13(18 Pt 1):5426-35.
25. Carpenito, C., Milone, M. C., Hassan, R., Simonet, J. C., Lakhali, M., Suhoski, M. M., *et al.* (2009). Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(9):3360-5.
26. Pegram, H. J., Park, J. H., Brentjens, R. J. (2014). CD28z CARs and armored CARs. *Cancer Journal* 20(2):127-33.
27. Chmielewski, M., Abken, H. (2015). TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opinion on Biological Therapy* 15(8):1145-54.
28. Brentjens, R. J., Rivière, I., Park, J. H., Davila, M. L., Wang, X., Stefanski, J., *et al.* (2011). Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 118(18):4817-28.
29. Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Carpenter, R. O., Kassim, S. H., Rose, J. J., Telford, W. G., *et al.* (2013). Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 122(25):4129-39.
30. Tasian, S. K., Gardner, R. A. (2015). CD19-redirected chimeric antigen receptor-modified T cells: A promising immunotherapy for children and adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Therapeutic Advances in Hematology* 6(5):228-41.

31. Kim, M. G., Kim, D., Suh, S. K., Park, Z., Choi, M. J., Oh, Y. K. (2016). Current status and regulatory perspective of chimeric antigen receptor-modified T cell therapeutics. *Archives of Pharmacal Research* 39(4):437-452.
32. Antony, P. A., Piccirillo, C. A., Akpınarli, A., Finkelstein, S. E., Speiss, P. J., Surman, D. R., *et al.* (2005). CD8<sup>+</sup> T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *The Journal of Immunology* 174(5):2591-601.
33. Levine, B. L. (2015). Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Cancer Gene Therapy* 22(2):79-84.
34. Mamonkin, M., Rouse, R. H., Tashiro, H., Brenner, M. K. (2015). A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood* 126(8):983-92.
35. Brentjens, R. J., Davila, M. L., Rivière, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., *et al.* (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine* 5(177):177ra38.
36. Davila, M. L., Rivière, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., *et al.* (2014). Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine* 6(224):224ra25.
37. Park, J. H., Rivière, I., Wang, X., Bernal, Y., Purdon, T., Halton, E., *et al.* (2015). Efficacy and safety of CD19-targeted 19-28z CAR modified T cells in adult patients with relapsed or refractory B-ALL. *Journal of Clinical Oncology* 33(15):7010-7010.
38. Park, J. H., Rivière, I., Gonen, M., Wang, X., Sénéchal, B., Curran, K. J., *et al.* (2018). Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 378(5):449-459.
39. Lee, D. W., Kochenderfer, J. N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y. K., Delbrook, C., Feldman, S. A., *et al.* (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet* 385(9967):517-528.

40. Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., *et al.* (2013). Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine* 368(16):1509-1518.
41. Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., *et al.* (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England Journal of Medicine* 371(16):1507-17.
42. FDA. (2017). FDA Briefing Document Oncologic Drugs Advisory Committee Meeting - BLA 125646 Tisagenlecleucel Novartis Pharmaceuticals Corporation. *FDA*: 1-66.
43. Grupp, S. A., Maude, S. L., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Callahan, C., *et al.* (2015). Durable remissions in children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19-targeted chimeric antigen receptor (CTL019). *Blood* 126(23):681.
44. Maude, S.L., Teachey, D.T., Rheingold, S.R., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., *et al.* (2016). Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. *Journal of Clinical Oncology* 34(15): 3011. Abstract.
45. Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., *et al.* (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 378(5):439-448.
46. Titov, A., Petukhov, A., Staliarova, A., Motorin, D., Bulatov, E., Shuvalov, O., *et al.* (2018). The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy-associated toxicities. *Cell Death and Disease* 9(9):897.
47. Leick, M. B., Maus, M. V. (2018). Toxicities associated with immunotherapies for hematologic malignancies. *Best Practice and Research: Clinical Haematology* 31(2):158-165.
48. Bonifant, C. L., Jackson, H. J., Brentjens, R. J., Curran, K. J. (2016). Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy – Oncolytics* 3:16011.
49. Neelapu, S. S., Tummala, S., Kebriaei, P., Wierda, W., Gutierrez, C., Locke, F. L., *et al.* (2018). Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15(1):47-62.

50. Gust, J., Hay, K. A., Hanafi, L. A., Li, D., Myerson, D., Gonzalez-Cuyar, L. F., *et al.* (2017). Endothelial activation and blood–brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells. *Cancer Discovery* 7(12):1404-1419.
51. Curran, K. J., Pegram, H. J., Brentjens, R. J. (2012). Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: Current understanding and future directions. *Journal of Gene Medicine* 14(6):405-15.
52. Scholler, J., Brady, T. L., Binder-Scholl, G., Hwang, W. T., Plesa, G., Hege, K. M., *et al.* (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Science Translational Medicine* 4(132):132ra53.
53. Maus, M. V., Haas, A. R., Beatty, G. L., Albelda, S. M., Levine, B. L., Liu, X., *et al.* (2013). T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunology Research* 1(1):26-31.
54. Maude, S.L., Barrett, D.M., Ambrose, D.E., Rheingold, S.R., Aplenc, R., Teachey, D.T., *et al.* (2015). Efficacy and safety of humanized chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells targeting CD19 in children with relapsed/refractory ALL. *Blood* 126: 683.
55. Proietti, E., Moschella, F., Capone, I., Belardelli, F. (2012). Exploitation of the propulsive force of chemotherapy for improving the response to cancer immunotherapy. *Molecular Oncology* 6(1): 1–14.
56. Maude, S. L., Hucks, G. E., Seif, A. E., Talekar, M. K., Teachey, D. T., Baniewicz, D., *et al.* (2017). The effect of pembrolizumab in combination with CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Journal of Clinical Oncology* 35(15):103.
57. Peng, W., Liu, C., Xu, C., Lou, Y., Chen, J., Yang, Y., *et al.* (2012). PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- $\gamma$  inducible chemokines. *Cancer Research* 72(20):5209-18.
58. Batlevi, C. L., Matsuki, E., Brentjens, R. J., Younes, A. (2016) Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 13(1):25-40.
59. Geyer, M. B., Brentjens, R. J. (2016). Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* 18(11):1393-1409.

60. Philip, B., Kokalaki, E., Mekkaoui, L., Thomas, S., Straathof, K., Flutter, B., *et al.* (2014). A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood* 124(8):1277-87.
61. Fesnak, A. D., June, C. H., Levine, B. L. (2016). Engineered T cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 16(9):566-81.
62. Grada, Z., Hegde, M., Byrd, T., Shaffer, D. R., Ghazi, A., Brawley, V. S., *et al.* (2013). TanCAR: A novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2(7): e105.
63. Qin, H., Cho, M., Haso, W., Zhang, L., Tasian, S. K., Oo, H. Z., *et al.* (2015). Eradication of B-ALL using chimeric antigen receptor-expressing T cells targeting the TSLPR oncoprotein. *Blood* 126(5):629-39.
64. Muñoz, L., Nomdedéu, J. F., López, O., Carnicer, M. J., Bellido, M., Aventín, A., *et al.* (2001). Interleukin-3 receptor  $\alpha$  chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* 86(12):1261-9.
65. Haso, W., Lee, D. W., Shah, N. N., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C. M., Pastan, I. H., *et al.* (2013). Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 121(7): 1165–1174.
66. Savoldo, B., Rooney, C. M., Di Stasi, A., Abken, H., Hombach, A., Foster, A. E., *et al.* (2007). Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30 $\zeta$  artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood* 110(7): 2620–2630.